

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LIA BEATRIZ BORTOLOTTO SPILLERE

**ESTUDO DO EFEITO DA SENSIBILIZAÇÃO CRUZADA
ENTRE CAFEÍNA E METILFENIDATO NO SISTEMA
ADENOSINÉRGICO EM CÉREBRO DE RATOS WISTAR
ADULTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane Budni

**CRICIÚMA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S756E Spillere, Lia Beatriz Bortolotto.

Estudo do efeito da sensibilização cruzada entre cafeína e metilfenidato no sistema adenosinérgico em cérebro de ratos wistar adultos / Lia Beatriz Bortolotto Spillere ; orientadora : Josiane Budni. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

63 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2014.

1. Atividade motora. 2. Sensibilização cruzada. 3. Metilfenidato. 4. Cafeína. 5. Adenosina. I. Título.

CDD. 22ª ed. 612.76



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata **Lia Beatriz Bortolotto Spillere** sob o título “**Estudo do efeito da sensibilização cruzada entre cafeína e metilfenidato no sistema adenosinérgico em cérebro de ratos wistar adultos**” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 05 de junho de 2014

Prof. Dr. Paulo César Lock da Silveira

Membro Relator

Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade

Membro Interno

Profa. Dra. Samira Valvassori

Membro Externo

Profa. Dra. Josiane Budni

Orientadora

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza

Coordenador do PPGCS

Dedico este trabalho a meus pais, irmãos, amigos, colegas e orientadora que acompanharam minha trajetória e fizeram deste sonho uma realidade.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de primeiramente agradecer a Deus que me acompanhou durante toda a minha trajetória acadêmica, me protegendo e guiando meus passos, permitindo-me evoluir sempre.

Aos meus pais Jailton e Viviane, padrasto Evandro, madrastra Fernanda, irmãos Sabrina e Francisco e demais familiares, por acreditarem em mim e me disponibilizar amor e apoio durante essa jornada.

A minha orientadora Carina Boeck, que apesar de não poder ter conseguido terminar essa jornada comigo, me proporcionou momentos de diálogos que instigaram a minha curiosidade e guiaram a minha trajetória nesse trabalho. Por todos os momentos inesquecíveis e de alegria.

A orientadora Josiane Budni, que aceitou o desafio de me orientar com muito carinho e dedicação. Agradeço pela disponibilidade e contribuição que muito acrescentaram nesse trabalho. Muito obrigada.

À doutoranda Michelle Garcez, pela disponibilidade, atenção e momentos de aprendizagem. Obrigada por dividir momentos de grande construção de conhecimentos sempre com muita paciência e dedicação.

Aos colegas de laboratório pelos momentos de aprendizado e por terem contribuído, de forma significativa, durante o meu processo de formação acadêmica.

Aos meus professores por todo o conhecimento adquirido durante minha formação, pelos bons momentos compartilhados e por terem ajudado a realizar um grande sonho.

A UNESCO, que proporcionou a mim educação de qualidade, além de conhecimentos científicos e experiências essenciais a minha formação.

Aos meus colegas de mestrado, Fernando, Solyane, Karina, Rafaela, Samira e demais colegas que compartilharam de minhas vivências, dos momentos de anseio e de alegria, obrigada por esses dois anos de amizade e companheirismo.

Aos meus amigos, que mesmo próximos ou distantes, sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a persistir e sempre acreditar nos meus sonhos.

“Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com elas coerentes.” (Paulo Freire)

RESUMO

Estudos prévios mostram que a administração crônica de cafeína na adolescência promove sensibilização cruzada com a administração aguda de metilfenidato na vida adulta. Esta sensibilização é caracterizada pelo aumento gradual e progressivo da atividade locomotora em ratos, induzida através da administração repetida de uma substância psicoestimulante. A cafeína é um antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina do tipo A1 e, principalmente, A2A. Ambos os receptores modulam o sistema dopaminérgico, local onde o metilfenidato atua produzindo seus efeitos estimulantes como um agonista indireto. O objetivo do estudo foi avaliar o comportamento locomotor de ratos adultos e a participação de componentes celulares adenosinérgicos no cérebro dos animais após o tratamento de indução de sensibilização cruzada entre cafeína e metilfenidato. Ratos Wistar machos (21 dias), foram tratados com solução de cafeína (0,3 g/L) na garrafa de água (livre acesso) durante quatro semanas, após passarem por um período de suspensão da substância (washout) de 14 dias ingerindo água, no 15º dia os animais foram desafiados com metilfenidato intraperitoneal (1 mg/kg and 10mg/kg, i.p.) ou solução salina. Após 05 minutos do desafio com metilfenidato, foram administrados o inibidor da 5'-nucleotidase e antagonistas dos receptores de adenosina. 2 horas depois, os animais foram submetidos a avaliação comportamental no teste do campo aberto. 48 horas após a administração do metilfenidato os animais foram mortos e o hipocampo e estriado foram dissecados para posterior análise da atividade de ecto-nucleotidases, pela hidrólise de ATP, ADP e AMP (1 mM). A avaliação da atividade locomotora através da análise das explorações horizontais dos animais mostrou que metilfenidato não induziu alteração locomotora nas doses administradas. Porém, quando os animais foram tratados cronicamente com cafeína na adolescência e receberam uma dose aguda com metilfenidato (10 mg/kg) na vida adulta apresentaram hiperlocomoção, indicando a sensibilização cruzada. Nenhum inibidor ou antagonistas adenosinérgicos (AOPCP, CPT e ZM241385) foi capaz de alterar o efeito hiperlocomotor observado nos ratos tratados com metilfenidato 10 mg/kg que foram tratados cronicamente com cafeína na adolescência. Em relação a hidrólise de nucleotídeos, no estriado não houve diferença entre nenhum dos grupos em estudo, nem para hidrólise do ATP (atividade das NTPDases) nem para hidrólise de AMP (atividade da ecto-5'-nucleotidase). No hipocampo houve diminuição da hidrólise de ATP nos animais que ingeriram cafeína e foram tratados

com metilfenidato 1 mg/kg, e a hidrólise do AMP diminuiu nos animais que ingeriram cafeína cronicamente e foram tratados com metilfenidato 1mg/kg e 10 mg/kg. Os resultados indicam que o uso crônico de cafeína, no presente estudo, pode ter gerado a adaptação do sistema adenosinérgico diminuindo a hidrólise de AMP e induzindo consequentemente, a redução da adenosina, na presença de um desafio estimulador desse sistema como o metilfenidato. Além disso, como previamente descrito na literatura, a cafeína apresentou efeitos de sensibilização cruzada com o metilfenidato. Porém, adicionais estudos são necessários para avaliar esta interação.

Palavras-chave: Sensibilização cruzada; Metilfenidato; cafeína; adenosina; ecto-5'-nucleotidase; ratos.

ABSTRACT

Previous studies shown that chronic caffeine administration in adolescence promotes cross-sensitization with methylphenidate acute administration in adult life. This sensitization is characterized by gradual and progressive increase of locomotor activity in rats induced by repeated administration of psychostimulants. Caffeine is a non-selective adenosine A1 and A2 receptor antagonist. These adenosine receptors modulate the dopaminergic system, which is stimulated by methylphenidate that act as an indirect agonist. The aim this study was to evaluate the locomotor activity and the involvement of adenosinergic system in the rats brain after induction of cross-sensitization induced by caffeine and methylphenidate treatment. Male Wistar rats (21 days old) were treated with caffeine solution (0.3 g/L) in bottle of water (freely available) during four weeks. After a period washout for 14 days with ingestion of water, on the 15th day, the animals were challenged with methylphenidate by intraperitoneal route (1 mg / kg and 10 mg / kg, i.p.) or saline. Five minutes after challenge with methylphenidate, the inhibitor of 5'-nucleotidase and antagonist of adenosine receptors were administered. The open-field test was performed 2 hours after methylphenidate administration. 48 hour after methylphenidate administration, the animals were killed and hippocampus and striatum removed for evaluation of ecto-nucleotidases activity and ATP, ADP and AMP (1 mM) hydrolyses. The assessment of locomotor activity by analyzing the horizontal explorations of animals showed that methylphenidate did not induce changes in locomotor activity in these doses evaluated. However, when animals were chronically treated with caffeine in adolescence and received an acute methylphenidate dose 10 mg/kg in adulthood showed hyperlocomotion, indicating cross-sensitization. Neither adenosinergic inhibitor nor antagonists (AOPCP, CPT and ZM241385) were able to change the hiperlocomotor effect observed in rats treated with methylphenidate 10 mg/kg and chronically treated with caffeine during adolescence. The analysis of ATP hydrolysis (NTPDase activity) and AMP hydrolysis (activity of ecto - 5' - nucleotidase) indicated no significant differences in the striatum. In the hippocampus was observed decreased of ATP hydrolysis in animals that ingesting caffeine and were treated with methylphenidate 1 mg /kg. The AMP hydrolysis decreased in animals that ingested chronically caffeine and treated with methylphenidate 1 mg/kg and 10 mg/kg. In the present study, the chronic administration of caffeine may have caused the adaptation of the adenosinergic system. The presence of a stimulatory

challenge such as methylphenidate can decrease AMP hydrolysis leading to reduction of extracellular adenosine. Furthermore, as previously described, caffeine had effects of cross-sensitization with methylphenidate. However, additional studies are needed to assess this interaction.

Keywords: cross-sensitization; methylphenidate; caffeine; adenosine; ecto -5'- nucleotidase; rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Síntese da dopamina e sua ligação aos receptores de membrana D1, D2, D3, D4 e D5.....	26
Figura 2 - Efeito do metilfenidato no sistema dopaminérgico.....	28
Figura 3 - Metabolismo intra e extracelular da adenosina.....	32
Figura 4 - Indução dos efeitos de adenosina através da ativação de receptores purinérgicos denominados P1(A ₁ , A _{2A} , A _{2B} e A ₃).....	33
Figura 5 - Heterodimerização dos receptores A _{2A} e dopaminérgicos D ₂ , assim como, entre receptores A ₁ e D ₁ , demonstrando assim a existência de receptores heterodímeros A _{2A} -D ₂ e A ₁ -D ₁ no cérebro.....	35
Figura 6 - Figura esquemática do protocolo experimental utilizado nesse estudo.....	40
Figura 7 - Efeito do tratamento crônico com cafeína durante a adolescência e agudo com metilfenidato na vida adulta na exploração horizontal de ratos.....	41
Figura 8 - Efeito do inibidor da ecto-5'-nucleotidase (AOPCP) e de antagonistas de receptores A ₁ e A _{2A} de adenosina (CPT e ZM241385, respectivamente) na hiperlocomoção de ratos induzida pela sensibilização cruzada entre cafeína e metilfenidato.	42
Figura 9 - Hidrólise de ATP no hipocampo de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato.....	43
Figura 10 - Hidrólise de ADP no hipocampo de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato.....	43
Figura 11 - Hidrólise de AMP no hipocampo de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato.....	44

Figura 12- Hidrólise de ATP no estriado de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato.....45

Figura 13 - Hidrólise de AMP no estriado de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato.45

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Grupos experimentais e especificação de tratamento farmacológico.....37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A₁- Receptor adenosinérgico A₁;
A_{2A}- Receptor adenosinérgico A_{2A};
A_{2B}- Receptor adenosinérgico A_{2B};
A₃- Receptor adenosinérgico A₃;
ADP - Adenosina difosfato;
AMP- Adenosina monofosfato;
AMPc - Adenosina monofosfato cíclico;
ANOVA- Análise de variância;
AOPCP - α - β -metileno adenosina difosfato;
ATP- Adenosina trifosfato;
CMP - Citidina monofosfato;
CPT - Ciclopentil-1,3-dimetilxantina – antagonista específico do receptor A₁ de adenosina;
DARPP-32 - AMPc de 32kDa;
E-NTPDase – Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase;
GMP - Guanosina monofosfato;
GPI – Glicofosfatidil inositol;
ICV - Intracerebroventricular ;
IMP – Inosina monofosfato;
IP- Intraperitonal;
L-DOPA - 3-hidroxi-L-tyrosina (levodopa);
NTPDase- Nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase;
PBS (tampão) – Tampão fostato;
PKA – Proteína cinase dependente de AMPc, do inglês *Protein Kinase A*;
SNC - Sistema nervoso central;
TCA - Ácido tricloroacético;
TDH- Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade;
UMP – Uridina monofosfato;
ZM 241385 - 4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazol[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil) fenol) – antagonista específico do receptor A_{2A} de adenosina.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. Sensibilização Cruzada	24
3. Sistema Dopaminérgico	25
4. Metilfenidato	27
5. Cafeína	29
6. Sistema Adenosinérgico	31
7. Interações entre os Sistemas Dopaminérgico e Adenosinérgico	34
8. METODOLOGIA	36
8.1 Animais e delineamento experimental	36
8.2 Protocolo de Tratamento	36
8.2.1 Tratamento crônico com cafeína	36
8.2.2 Tratamento Agudo com Metilfenidato	36
8.3 Procedimento Cirúrgico	37
8.3.1 Aplicação dos bloqueadores adenosinérgicos	37
8.4 Avaliação da atividade locomotora	38
8.5 Eutanásia dos animais	38
8.6 Atividade Enzimática	38
8.7 Determinação da Proteína	39
8.8 Análise Estatística	39
9. APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS	41
10. Discussão	46
11. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO(S)	62
ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	63

1. INTRODUÇÃO

Estudos prévios mostram que a administração crônica de cafeína na adolescência promove sensibilização cruzada com a administração aguda de metilfenidato na vida adulta. Esta sensibilização é caracterizada pelo aumento gradual e progressivo da atividade locomotora em ratos, induzida através da administração repetida de uma substância psicoestimulante. A cafeína é um antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina do tipo A1 e, principalmente, A2A. Ambos os receptores modulam o sistema dopaminérgico, local onde o metilfenidato atua produzindo seus efeitos estimulantes como um agonista indireto.

O objetivo geral do estudo foi avaliar o comportamento locomotor de ratos adultos e a participação de componentes celulares adenosinérgicos no cérebro dos animais após o tratamento de indução de sensibilização cruzada entre cafeína e metilfenidato. Seus objetivos específicos consistiram em avaliar a locomoção de ratos adultos tratados agudamente com metilfenidato e que tenham sido tratados cronicamente com cafeína durante a adolescência, avaliar a atividade de ecto-nucleotidases no hipocampo e estriado de ratos em resposta a associação dos tratamentos com cafeína e metilfenidato e avaliar o efeito de antagonistas de receptores de adenosina na resposta da associação dos tratamentos com cafeína e metilfenidato na locomoção de ratos e na atividade de ecto-nucleotidases no hipocampo desses animais.

Há necessidade de mais estudos focando a atuação de cafeína e metilfenidato nas vias intracelulares pelas quais essas substâncias exercem suas propriedades psicoestimulantes e as interações farmacológicas decorrentes de seu uso. São substâncias psicoativas com potencial de dependência. Essas apresentam sensibilização cruzada observada em estudos realizados em modelos animais, onde os animais jovens são tratados cronicamente com uma das substâncias e desafiados com uma dose da outra quando adultos. É importante salientar que há estudos onde é evidenciado que a sensibilização cruzada atua aumentando a locomoção (Boeck et al., 2009), porém o mecanismo envolvido nesse processo ainda é pouco conhecido. Portanto, o presente trabalho visa entender o mecanismo pelo qual ocorre a interação entre o consumo de cafeína e o uso do metilfenidato, tendo como alvo de estudo o sistema adenosinérgico.

2. SENSIBILIZAÇÃO CRUZADA

A sensibilização celular é caracterizada pela administração repetida e espaçada de algumas substâncias, principalmente as psicoestimulantes, capazes de produzir um aumento de certos efeitos neuroquímicos e comportamentais decorrentes do seu uso ou de outras substâncias similares. Tal fenômeno, quando produzido a partir da exposição a estimulantes, é considerado como um possível fator de dependência dessas substâncias, pois o seu consumo repetido provoca o aumento da sensibilidade dos sistemas de neurotransmissão relacionados com o comportamento de recompensa, sendo o sistema dopaminérgico o principal substrato neural envolvido nesse sistema (Robinson, 1993; Schenk e Davidson, 1998). Nos humanos, essa sensibilização é traduzida pelo aumento da fissura que o indivíduo sente pela substância com o uso constante (Gerlach et al., 2013).

Quando um pré-tratamento com um psicoestimulante leva ao aumento da sensibilização da célula ao efeito de outro psicoestimulante dá-se o nome de sensibilização cruzada (Antoniou et al., 1998). Estudos comportamentais em animais experimentais mostraram que a administração do psicoestimulante cafeína promove sensibilização cruzada com metilfenidato. Isso significa que a cafeína administrada cronicamente *per se* em doses que não altera a atividade comportamental, associada ao metilfenidato em uma dose que *per se* também não induz alteração comportamental, os dois juntos podem induzir aumento da resposta comportamental (Holtzman, 1987; Jain e Holtzman, 2005).

O estudo de Boeck et al. (2009) demonstrou que há importante sensibilização induzida por cafeína no efeito estimulante do metilfenidato com a participação da fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32 KDa (DARPP-32) nas áreas cerebrais dopaminérgicas envolvidas na regulação de comportamentos motores e de ação.

A sensibilização comportamental caracteriza-se pelo aumento gradual e progressivo da atividade locomotora, induzida através da administração repetida de uma substância (Post e Contel, 1983; Robinson e Becker, 1986). Trata-se de um acontecimento duradouro que gera processos neuroadaptativos, principalmente no sistema dopaminérgico na região mesolímbica, dos quais estão associados ao desenvolvimento da farmacodependência (Robinson e Berridge, 1993; Nestler e Aghajanian, 1997; Covington e Miczek, 2001).

3. SISTEMA DOPAMINÉRGICO

A dopamina é um neurotransmissor pertencente a família das catecolaminas. Sua síntese ocorre através da ação da enzima tirosina hidroxilase, a qual converte o aminoácido tirosina em L-DOPA, sendo esse descarboxilado para a formação da dopamina (Elsworth e Roth, 1997).

Após sua síntese, a dopamina é translocada para vesículas secretoras para seu armazenamento, proteção e secreção. Ao ser liberada na fenda sináptica ou no espaço extracelular, a dopamina se liga aos receptores de membrana que estão acoplados à proteína G. Na fenda sináptica, a dopamina que não é ligada ao receptor, é recaptada pelo transportador de dopamina (DAT) (Ben-Jonathan e Hnasko, 2001).

Há cinco tipos de receptores dopaminérgicos de membrana (D_1 , D_2 , D_3 , D_4 e D_5), os quais são agrupados em duas subfamílias, de acordo com suas propriedades bioquímicas e farmacológicas: 1) receptores ligados ao D_1 que compreendem os receptores D_1 e D_5 ; 2) receptores ligados ao D_2 que compreendem D_2 , D_3 e D_4 , sendo que esses receptores estão acoplados à proteína G (Vallone et. al., 2000; Ben-Jonathan e Hnasko, 2001; Goodman e Gilman, 2007).

As atividades dopaminérgicas exercem suas atividades através de diferentes sistemas: 1) o sistema nigro-estriatal está envolvido nos efeitos da dopamina sobre o controle motor; 2) o sistema túbero hipofisário está envolvido nos efeitos sobre o sistema endócrino; 3) o sistema meso-límbico/meso-cortical está envolvido nos efeitos comportamentais (Greenstein e Greenstein, 2000; Katzung et al., 2001; Greenspan e Gardner, 2004).

É muito reconhecida a importância da neurotransmissão dopaminérgica envolvida na atenção e função cognitiva. Um exemplo, é a deficiência envolvendo o sistema dopaminérgico que causa transtornos psiquiátricos como por exemplo, o transtorno de atenção e hiperatividade (TDAH) (Del Campo et al., 2011).

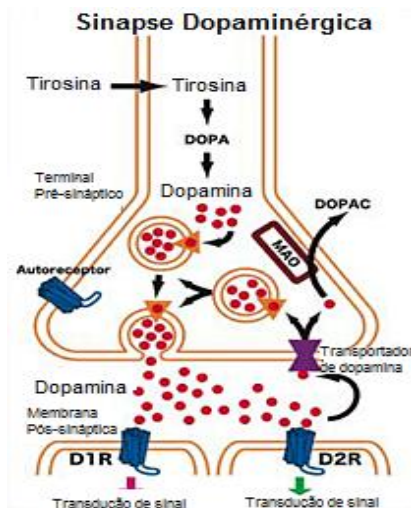


Figura 1: A síntese da dopamina ocorre através da ação da enzima tirosina hidroxilase, a qual converte o aminoácido tirosina em L-DOPA, sendo esse descarboxilado para a formação da dopamina. Após sua síntese, a dopamina é translocada para vesículas secretoras para seu armazenamento, proteção e secreção. Ao ser liberada na fenda sináptica ou no espaço extracelular, a dopamina se liga aos receptores de membrana (D1, D2, D3, D4 e D5) que estão acoplados à proteína G. Na fenda sináptica, a dopamina que não é ligada ao receptor, é recaptada pelo transportador de dopamina (DAT). Fonte : Adaptado de : http://www.nibb.ac.jp/annual_report/2004/img/240-01.jpg.

4. METILFENIDATO

O metilfenidato é um dos estimulantes mais utilizados terapeuticamente para tratamento do TDAH em crianças e adultos, sendo utilizado por especialistas como tratamento primário em tais casos clínicos (Olfson et al., 2002; Arnsten, 2006; Zuvekas et al., 2006). O efeito do metilfenidato na melhora da concentração e atenção e o aumento do estado de vigília, se deve a sua ação em aumentar os níveis de norepinefrina e dopamina, inibir sua recaptação e facilitar a liberação dos mesmos, especialmente no córtex pré-frontal dorsolateral (Volkow et al., 2002). Apesar de existirem diversos estudos sobre os efeitos terapêuticos do metilfenidato, há uma preocupação relacionada com seus efeitos colaterais negativos, tendo seu principal foco no seu abuso, mal uso e vício (Zhu et al., 2011).

No estudo de Linsenn et al. (2012), realizado em humanos saudáveis, foram testadas diferentes doses de metilfenidato a fim de que fosse observado seu efeito sobre a memória e outras funções cognitivas nesses indivíduos. Os resultados desse estudo sugerem que o metilfenidato atua no aumento da consolidação da memória. Outro estudo envolvendo o metilfenidato e a memória, realizado por Wong e Stevens (2012), teve como sujeitos dezoito crianças e adolescentes com diagnóstico de TDAH. O estudo trouxe como resultado que o metilfenidato atua no aumento da conectividade funcional de áreas envolvidas na memória de trabalho.

Há um extenso número de estudos na literatura os quais demonstram a medicação estimulante, quando usada como prescrita, é segura e eficaz para melhorar a atenção e diminuir os sintomas de hiperatividade e impulsividade (Adler et al., 2009; Weyandt e DuPaul, 2006). Porém, estudos indicam que há uma percentagem significativa de adolescentes e adultos envolvidos em mau uso do metilfenidato não prescrito por médico (Weyandt et al., 2013).

O uso de estimulantes não prescritos por médicos representa a segunda forma mais comum de uso de drogas ilícitas na faculdade, perdendo apenas para o uso de maconha (Johnston et al., 2004).

As razões pelas quais os estimulantes prescritos são mal utilizados incluem a euforia e ajuda a lidar com fatores estressantes relacionados ao seu ambiente educacional, além de aumentar a concentração (Upadhyaya et al., 2005).

Grandes doses de estimulantes podem levar à psicose, convulsões e eventos cardiovasculares. A indução de estados esquizofrênicos em abusadores está bem documentada, embora o

aparecimento de tais estados em crianças em doses prescritas de medicação estimulante é observada com muito menos frequência (Polchert e Morse, 1985; Masand et al., 1991; Murray, 1998). Os efeitos cardiovasculares mais comumente observados associados com TDAH e medicamentos estimulantes incluem hipertensão e taquicardia. Além disso, a cardiomiopatia, arritmias cardíacas, e vasculite necrosante têm sido descritos (European Medicines Agency, 2007).

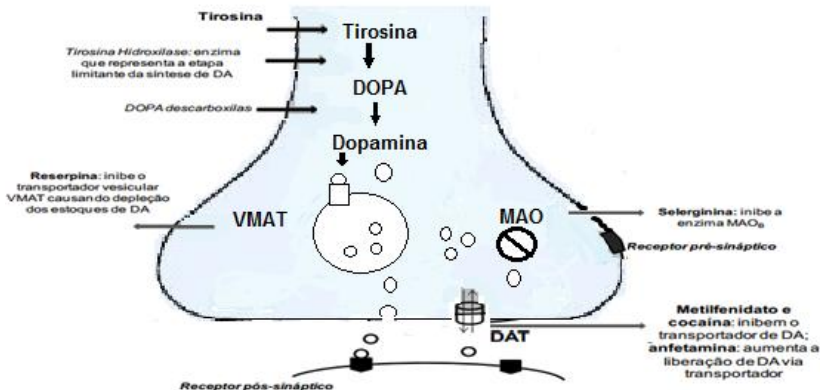


Figura 2: O metilfenidato atua aumentando a concentração extracelular de dopamina na fenda sináptica, que é liberada em resposta a um estímulo. Esse aumento de dopamina ocorre devido a várias ações incluindo o bloqueio dos transportadores de dopamina (DAT) inibindo assim sua recaptação e ampliando a duração de sua resposta, desinibição dos receptores de D1 de dopamina e ativação desses receptores no neurônio pós-sináptico, facilitando sua liberação e consequente permanência por mais tempo na fenda sináptica. Fonte: O autor

5. CAFEÍNA

As metilxantinas são derivados de plantas que incluem a cafeína, a teofilina e a teobromina, as quais estão entre as substâncias estimulantes mais consumidas no mundo (Daly, 2007).

A cafeína (1,3,7 trimetilxantina) pode ser encontrada em cafés, chás, refrigerantes, energéticos, chocolates e medicamentos. Sendo assim, essa substância é consumida amplamente na dieta humana (Dews, 1982; Barone e Roberts, 1996; Reissig et al., 2009; Heckman et al., 2010).

Em relação à administração de cafeína, estudos mostram que tanto a via subcutânea quanto a administração oral possuem farmacocinética e efeitos comportamentais semelhantes em ratos (Lau e Wang, 1996; Lau et al., 1997; Wang e Lau, 1998). Neste roedores, a meia-vida de eliminação é de 3 horas, tanto a via oral quanto subcutânea. A administração via oral é preferencial na administração crônica porque evita a necrose subcutânea devido às injeções diárias (Lau et al., 1997).

Estudos indicam que o sistema dopaminérgico também possui papel mediador nos efeitos comportamentais induzidos pela cafeína. Além disso, a cafeína interage com o sistema dopaminérgico, potencializando o efeito psicoestimulante de seus agonistas (Hsu et al., 2010).

Além do seu efeito no sistema dopaminérgico, a cafeína possui efeitos no sistema adenosinérgico. Essa substância possui propriedades estimulantes, sendo que ao atingir o córtex cerebral exerce suas funções através da interação com neurotransmissores. Após sua ingestão, a cafeína desenvolve seus efeitos biológicos através do antagonismo não seletivo nos receptores de adenosina (Fredholm et al., 1999; Davis et al., 2003; Higdon e Frei, 2006). Os receptores A_1 e A_{2A} são ativados a uma baixa concentração basal de adenosina e são os principais alvos da cafeína. Por outro lado, para que ocorra a inibição dos receptores A_{2B} e A_3 , é necessário elevadas concentrações de cafeína (Hsu et al., 2009).

Ao atuar como antagonista no receptor específico da adenosina A_{2A} , a cafeína interage nos sistemas neuronais envolvidos no reforço das drogas, na sensibilização motora e no efeito terapêutico na doença de Parkinson (Hsu et al., 2010). Estudos indicam que além do sistema adenosinérgico, o sistema dopaminérgico também possui papel mediador nos efeitos comportamentais induzidos pela cafeína. A cafeína

interage com o sistema dopaminérgico, potencializando o efeito psicoestimulante de seus agonistas (Hsu et al., 2010).

6. SISTEMA ADENOSINÉRGICO

Através de seu papel neuromodulador, a adenosina regula a liberação de vários neurotransmissores, sendo essa ação realizada tanto na região pré quanto pós-sináptica (Cunha, 2001; Durwinnie e Masino, 2001; Ribeiro et al., 2002). A adenosina age como neuroprotetor no sistema nervoso através da ativação de seus receptores específicos A_1 e A_{2A} , visto que ao regular a liberação de neurotransmissores excitatórios reduz o dano causado pela excitotoxicidade (Durwinnie e Masino, 2001). Esta por sua vez, é causada pelo aumento da concentração de neurotransmissores excitatórios durante a transmissão sináptica, induzindo o dano e consequente morte neuronal (Meldrum, 2000).

A produção de adenosina no meio intracelular ocorre por meio de dois processos: 1) através da clivagem da S-adenosil-homocisteína (Dunwiddie e Masino, 2001) e 2) através da degradação do nucleotídeo monofosfatado (AMP) pela enzima 5'-nucleotidase (Brundege e Dunwiddie, 1997). A adenosina-5'-trifosfato (ATP) é a fonte primária de substrato para que ocorra a formação da adenosina. No meio intracelular atua como fonte de energia e no meio extracelular tem uma importante ação como neurotransmissor do efeito excitatório rápido, além de atuar como neuromodulador e como fator de crescimento do SNC (Neary et al., 1996; Vizi et al., 1997). As funções do ATP são exercidas através da ativação de receptores específicos chamados P2Y (P2Y1-14) e P2X (P2X1-7), sendo receptores metabotrópicos e ionotrópicos, respectivamente (Burnstock, 2004).

A hidrólise dos nucleotídeos de adenina extracelulares é realizada por enzimas denominadas ecto-nucleotidases, sendo destacadas a NTPDase (EC 3.6.1.5, apirase, CD39, ATP difosfohidrolase) e a 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5), as quais tem a capacidade de realizar o controle da disponibilidade de ligantes como ATP e adenosina aos seus receptores específicos (Zimmermann, 2001).

A NTPDase é uma enzima pertencente à família da E-NTPDases, sendo essa família de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados, principalmente ATP e ADP, respectivamente. A NTPDase possui duas regiões transmembranas que estão próximas ao grupamento amino e carboxi terminal, com seu sítio voltado para o meio extracelular (Zimmermann, 2001). Dependendo de sua localização tecidual, sua atividade enzimática irá possuir diferentes papéis fisiológicos (Sarkis et al., 1995; Zimmermann, 1999; Bonan et al., 2001).

A enzima ecto-5'-nucleotidase fica ancorada à membrana plasmática através de uma molécula denominada GPI (glicofosfatidilinositol) com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Porém, formas solúveis e clivadas dessa enzima também são encontradas (Zimmermann, 2001; Hunsucker et al., 2005). A enzima catalisa a desfosforilação de vários nucleotídeos 5'-monofosfatados como CMP (Citidina monofosfato), IMP (Inosina monofosfato), UMP (uridina monofosfato), GMP (Guanosina monofosfato) e AMP à seus respectivos nucleosídeos (Zimmermann, 1996). Entretanto, foi demonstrado que a ecto-5'-nucleotidase hidrolisa mais eficientemente o AMP, sendo então considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina extracelular (Zimmermann, 1996; Zimmermann et al., 1998; Zimmermann, 2001).

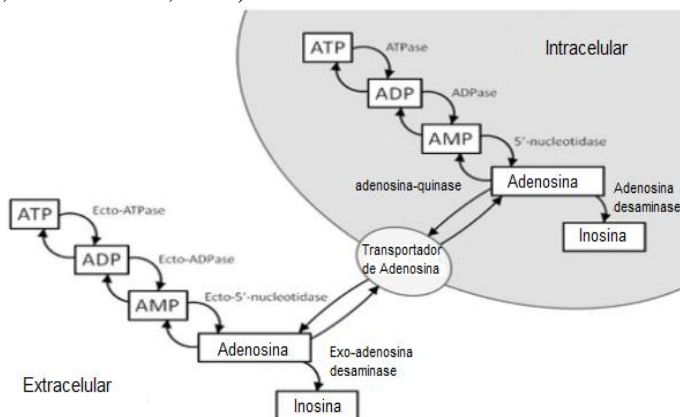


Figura 3: Metabolismo intra e extracelular da adenosina. Adaptado de <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fneur.2011.00087/full>

A adenosina induz seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos denominados P1, divididos em quatro subtipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , os quais se diferenciam quanto à afinidade pela adenosina, estruturas moleculares, distribuição tecidual e perfil farmacológico (Burnstock, 1972; Ralevic e Burnstock, 1998; Durwinnie e Masino, 2001; Fredholm et al., 2001). Os receptores A_1 e A_{2A} apresentam alta afinidade pela adenosina, enquanto que os receptores A_{2B} e A_3 têm baixa afinidade (Ribeiro et al., 2002). Segundo Pedrazza et al. (2007) o ATP e a adenosina podem desempenhar importante efeito sobre os mecanismos referentes a plasticidade sináptica e formação da memória. Estudos anteriores demonstraram que a atividade das ectonucleotidases são

alteradas durante o período de consolidação da memória avaliada em roedores através da tarefa de esquila inibitória.

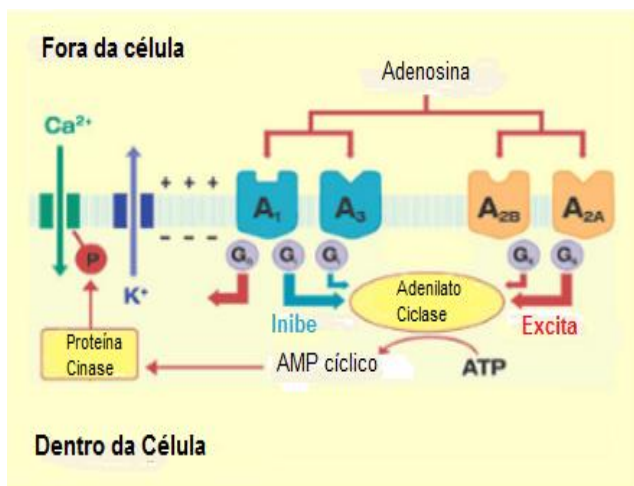


Figura 4: A adenosina induz seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos denominados P1, divididos em quatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, os quais se diferenciam quanto à afinidade pela adenosina, estruturas moleculares, distribuição tecidual e perfil farmacológico. Adaptado de: http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a_11/a_11_m/a_11_m_cyc/a_11_m_cyc.html.

7. INTERAÇÕES ENTRE OS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO E ADENOSINÉRGICO

Segundo Fuxe e Ungerstedt (1974), os efeitos moduladores que a adenosina exerce sobre o sistema dopaminérgico, têm sido alvos de investigações devido a sua importância em patologias humanas, como por exemplo, a esquizofrenia e a doença de Parkinson. Através das interações antagonistas de adenosina/dopamina, ficou evidenciado que a adenosina pode inibir vários efeitos da dopamina no córtex cerebral e nos gânglios basais.

A indução da atividade motora ativada através dos antagonistas de adenosina, como por exemplo a cafeína, é inibida pelo bloqueio dos receptores de dopamina ou através da depleção desse neurotransmissor. A estimulação motora que é induzida pelos agonistas da dopamina são inibidas por agonistas adenosinérgicos e potencializadas pelos antagonistas de adenosina (Ferre et al., 1997; Franco et al., 2000; Ferre et al., 2001).

O sistema dopaminérgico pode ser modulado pela adenosina, através da ativação dos receptores adenosinérgicos A_1 e A_{2A} (Durwinnie e Masino, 2001; Fisone et al., 2004). Enquanto os receptores A_1 são expressos em todo o cérebro, os receptores A_{2A} ficam mais restritos aos gânglios basais. Através da análise bioquímica em células, foi demonstrada a existência da heterodimerização dos receptores A_{2A} e dopaminérgicos D_2 , assim como, entre receptores A_1 e D_1 (Giné et al., 2000; Agnati et al., 2003; Canals et al., 2003), demonstrando assim a existência de receptores heterodímeros A_{2A} - D_2 e A_1 - D_1 no cérebro (Ferré et al., 1997; Franco et al., 2007).

O receptores A_{2A} de adenosina e D_1 de dopamina ligados aos membros da família da proteína G, estão relacionados com a produção intracelular de AMPc, como consequência da ativação da via de sinalização da PKA (Fredholm, 1977; Stoof e Kebabian, 1981).

Através desses receptores heterodímeros, pode-se compreender melhor acerca das interações entre antagonistas destes receptores que são encontrados nas redes neuronais do cérebro (Ferré et al., 1997; Fuxe et al., 1998). Essa compreensão das interações entre receptores têm sido útil no desenvolvimento de vários tratamentos, incluindo a terapia para o TDAH (Fuxe et al., 2007; Ferré et al., 2008; Maggio et al., 2009).

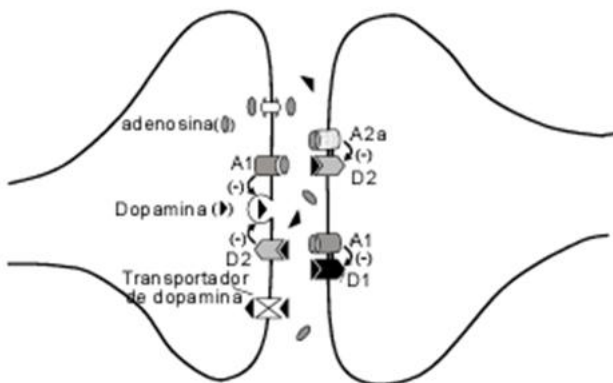


Figura 5: Foi demonstrada a existência da heterodimerização dos receptores A_{2A} e dopaminérgicos D_2 , assim como, entre receptores A_1 e D_1 , demonstrando assim a existência de receptores heterodímeros A_{2A} - D_2 e A_1 - D_1 no cérebro.
 Fonte: <http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/vol28/n3/artigos/art160.htm>

8. METODOLOGIA

8.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos Wistar machos (75-85 g), com idade de 25 dias provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. Os animais foram acondicionados em 5 por caixa, com ciclo claro-escuro de 12 horas (7:00 às 19:00) e comida e água disponíveis livremente. O ambiente foi mantido a temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Os procedimentos foram realizados entre as 8 horas e 13 horas. Cada animal foi utilizado apenas uma vez.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL), após a aprovação do presente projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (110/2013-2). O observador dos testes comportamentais foi cego para os grupos para evitar falsos resultados nas análises.

8.2 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

8.2.1 Tratamento crônico com cafeína

Durante o tratamento crônico com cafeína (28 dias) ratos jovens tiveram livre acesso à solução de cafeína 0,3 g/L (Gasior et al., 2000) ou água de beber. A solução de cafeína foi trocada para uma solução nova a cada três dias (Boeck et al., 2009) e foi medido o volume de líquido consumido. Após o tratamento crônico com cafeína, ou consumo de água (ingestão de cafeína ou água), foi dado um período sem receber a substância (*washout*) de 14 dias.

8.2.2 Tratamento Agudo com Metilfenidato

No 15º dia de *washout*, os animais foram submetidos a administração aguda i.p. de metilfenidato nas doses de 1 mg/kg ou 10 mg/kg (1 mL/kg de massa corporal). O fármaco Ritalina® (metilfenidato) foi macerado e suspenso em soro fisiológico (solução salina esterilizada) para injeção. Após o tratamento com Metilfenidato, o total de 144 animais foi utilizado em dois testes experimentais: avaliação da locomoção (n=12 animais/grupo (Grupos Experimentais 1

ao 12); Vianna et al., 2001) e a avaliação da atividade enzimática (n=8 animais/grupo (Grupos Experimentais 1 ao 6); Chan, 1986).

Abaixo a tabela de especificação dos grupos experimentais:

Tabela 1. Grupos experimentais e especificação de tratamento farmacológico.

Via de tratamento e substância				
n°	Grupo	garrafa	i.c.v.	i.p.
1.	CONTROLE	água	salina	Salina
2.	METIL 1.	água	salina	metilfenidato 1mg/kg
3.	METIL 10	água	salina	metilfenidato 10 mg/kg
4.	CAF	cafeína	salina	Salina
5.	CAF + METIL 1.	cafeína	salina	metilfenidato 1mg/kg
6.	CAF + METIL 10	cafeína	salina	metilfenidato 10 mg/kg
7.	CAF + AOPCP + METIL 1.	cafeína	AOPCP	metilfenidato 1mg/kg
8.	CAF + AOPCP + METIL 10	cafeína	AOPCP	metilfenidato 10 mg/kg
9.	CAF + CPT + METIL 1.	cafeína	CPT	metilfenidato 1mg/kg
10.	CAF + CPT + METIL 10	cafeína	CPT	metilfenidato 10 mg/kg
11.	CAF + ZM + METIL 1.	cafeína	ZM	metilfenidato 1mg/kg
12.	CAF + ZM + METIL 10	cafeína	ZM	metilfenidato 10 mg/kg

8.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Dois dias antes da administração de metilfenidato (12 dias de abstinência do tratamento com cafeína), os animais passaram por uma cirúrgica estereotáxica. Os ratos, com então 65 dias de vida, foram anestesiados com cloridrato de cetamina 80 mg/kg e xilasina 10 mg/kg intramuscular e posicionados no aparelho estereotáxico. Foi removida a pele na região craniana do rato e uma cânula guia 27G de 7 mm de comprimento foi posicionada de acordo com as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior á linha bregma; 1,5 mm à direita do bregma; sendo a cânula assim implantada à 2,6 mm de profundidade, no ventrículo lateral direito. A fixação da cânula no crânio foi feita com cimento acrílico. Os animais foram testados 72 horas após a cirurgia, após estarem completamente recuperados desta.

8.3.1 Aplicação dos bloqueadores adenosinérgicos

Os bloqueadores adenosinérgicos foram aplicados pela via intracerebroventricular (i.c.v.) em um volume de 2 µL, 72 horas após a

cirurgia e 5 minutos depois da administração i.p de metilfenidato através de uma agulha 30G de 8mm. Foram infundidos solução salina (NaCl 0.9%), ou AOPCP (0,1 nmol; inibidor da ecto-5'-nucleotidase), ou CPT (0,1 pmol; antagonista de receptores A₁ de adenosina), ou ZM241385 (0,1 pmol; antagonista de receptores A₂ de adenosina). As doses de CPT, ZM241385 e AOPCP empregadas no presente estudo foram selecionadas com base em estudos anteriores (El Yacoubi et al., 2000; Boeck et al., 2004). Após a infusão do inibidor e dos antagonistas os animais foram observados quanto a sua locomoção e não foram utilizados para análise da medida da atividade das ecto-nucleotidases. No final da experimentação, os ratos foram decapitados para análise morfológica da cânula e do tecido cerebral. Animais com deslocamento ou extravio de cânula, ou lesão cerebral foram excluídos do estudo.

8.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

A atividade locomotora foi avaliada 2 horas após a administração aguda de metilfenidato nas diferentes doses, usando a tarefa de exploração ao campo aberto. Cada animal foi colocado uma caixa de 40 x 60 cm, delimitada por quatro paredes de 50 cm de altura, sendo três em madeira, e a parede frontal de vidro. O assoalho é dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram colocados cuidadosamente no quadrante superior esquerdo a fim de explorar a arena por 5 minutos, onde foram observados e contados os cruzamentos entre as linhas pretas ("crossings"), chamados exploração horizontal. Após a avaliação os animais foram retirados da caixa e retornaram para a caixa-moradia até eutanásia para retirada do tecido cerebral.

8.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Três dias após a administração de metilfenidato os animais (71 dias de vida), os animais foram decaptados por guilhotina para a retirada do cérebro. Os hipocampus e os estriados foram dissecados e preparados para a avaliação da atividade das enzimas descrita abaixo. Os cadáveres de todos os animais foram acondicionados em saco branco leitoso, congelados a -20°C para posterior incineração conforme instruções da Instituição.

8.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O cérebro dos ratos foi retirado para a dissecação dos hipocampus e dos estriados em tampão PBS gelado, pH 7,4, fatiados transversalmente em fatias de 400 µm de espessura em um fatiador de tecidos (McIlwain Chopper).

Duas fatias (aproximadamente 200 µg de proteína) de cada estrutura foram rapidamente pré-incubadas em meio constituído de solução tampão HEPES (120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 2 mM de CaCl_2 e 10% de glucose), pH 7.4 e gaseificada com O_2 (Boeck et al., 2005 – adaptado) aquecido a 37 °C durante 10 minutos. O tampão HEPES foi trocado para uma solução nova e pré-aquecida antes do início da reação para evitar a atividade de enzimas possivelmente liberadas por células que tenham sido danificadas no momento do corte do tecido. A reação iniciou com a adição dos nucleotídeos ATP, ADP ou AMP, para uma concentração final de 1 mM e incubados por 20 min. A atividade da enzima ecto-NTPDase foi medida pela hidrólise do ATP e ADP, e a atividade da ecto-5'-nucleotidase foi avaliada pela hidrólise do AMP. A reação foi interrompida quando uma amostra reacional de 200 µL foi adicionada a 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% gelado. O fosfato inorgânico não enzimático liberado do nucleotídeo no meio reacional sem fatias, e o fosfato inorgânico liberado de fatias sem o nucleotídeo foram subtraídos do fosfato inorgânico total produzido durante a incubação.

Todo o ensaio enzimático foi realizado em triplicata por animal para cada nucleotídeo. O fosfato inorgânico foi mensurado de acordo com o método de Chan e cols. (1986) e a atividade enzimática foi expressa em $\text{nmol por Pi.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

8.7 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

As proteínas foram determinadas pelo método Coomassie Blue, de acordo com Bradford, usando albumina de soro bovino com padrão (Bradford, 1976).

8.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através do programa SPSS versão 14.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar distribuição normal dos dados. O consumo de água ou cafeína e as medidas bioquímicas estão apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados referentes a medida da locomoção e da atividade das enzimas foram analisados por ANOVA de uma via

seguido pelo teste post hoc de Tukey HSD e de Dunnett (comparando todos os grupos com o grupo controle), respectivamente.

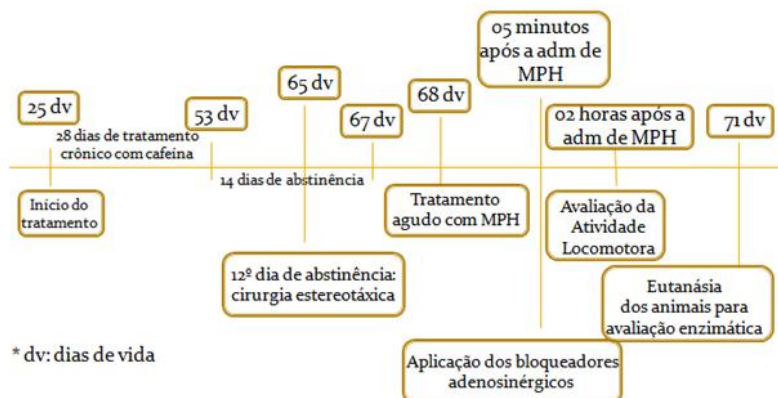


Figura 6: Figura esquemática do protocolo experimental utilizado nesse estudo. Fonte: o autor.

9. APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

O controle do consumo de líquido estimou a dose diária média consumida de água ou cafeína por rato, durante os 28 dias de tratamento. Ao final dos 28 dias os animais que tiveram acesso à água consumiram no total $92,8 \pm 11$ mL e àqueles com acesso à cafeína consumiram $92,6 \pm 13$ mL. A média diária de consumo por rato foi de 30,9 mL e 30,8 mL de água e cafeína, respectivamente. Esse consumo resultou na dose diária de aproximadamente 9,3 mg de cafeína por rato.

A avaliação da atividade locomotora em animais é um parâmetro importante para análise de alterações na atividade locomotora induzida por psicoestimulantes, tais como cafeína e metilfenidato. A análise das explorações horizontais dos animais mostrou que metilfenidato não induziu alteração locomotora nas doses administradas. Porém, quando os ratos foram tratados cronicamente com cafeína na adolescência e receberam uma dose aguda com metilfenidato 10mg/kg na vida adulta apresentaram hiperlocomoção, indicando a sensibilização cruzada ($p = 0,043$) (Figura 7).

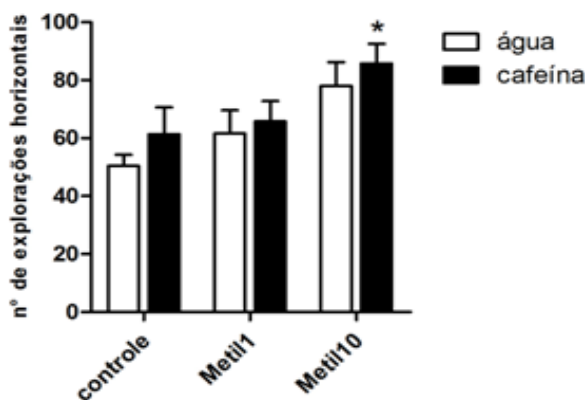


Figura 7. Efeito do tratamento crônico com cafeína durante a adolescência e agudo com metilfenidato na vida adulta na exploração horizontal de ratos. Os animais foram tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e após 14 dias de washout receberam uma aplicação i.p. de metilfenidato nas doses de 1mg/kg ou 10 mg/kg de massa corporal. Duas horas após a administração de metilfenidato os animais foram avaliados no campo aberto quanto a sua exploração horizontal. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 12 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. Metil1 = metilfenidato 1 mg/kg; Metil10 = metilfenidato 10 mg/kg.

Para avaliar a participação de componentes adenosinérgicos no efeito hiperlocomotor induzido pela sensibilização cruzada entre cafeína e metilfenidato, os ratos foram submetidos a administração por via i.c.v. com inibidor da ecto-5'-nucleotidase (AOPCP) ou antagonista do receptor A_1 (CPT), ou antagonista do receptor A_{2A} (ZM241385). Nenhum dos fármacos foi capaz de alterar o efeito hiperlocomotor observado nos ratos tratados com metilfenidato 10 mg/kg que foram tratados cronicamente com cafeína na adolescência (Figura 8).

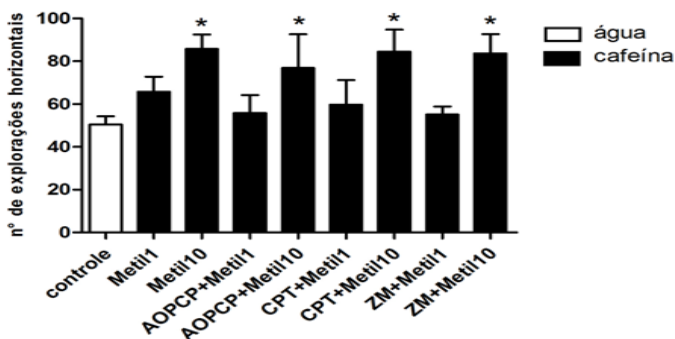


Figura 8. Efeito do inibidor da ecto-5'-nucleotidase (AOPCP) e de antagonistas de receptores A_1 e A_{2A} de adenosina (CPT e ZM241385, respectivamente) na hiperlocomução de ratos induzida pela sensibilização cruzada entre cafeína e metilfenidato. Os animais foram tratados cronicamente de cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e após 14 dias de washout a receberam uma aplicação i.p. de metilfenidato nas doses de 1 mg/kg ou 10 mg/kg de massa corporal. Cinco minutos antes da avaliação comportamental os ratos foram tratados i.c.v. com AOPCP, CPT ou ZM241385. Duas horas após a administração de metilfenidato os animais foram avaliados no campo aberto quanto a sua exploração horizontal. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média de 9-12 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. Metil1 = metilfenidato 1 mg/kg; Metil10 = metilfenidato 10 mg/kg.

A hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP ou AMP foi avaliada através da quantificação do fosfato inorgânico total produzido durante a incubação das fatias de hipocampo dos ratos tratados com cafeína e metilfenidato. Quando avaliada a hidrólise de ATP no hipocampo, verificou-se uma diminuição significativa da hidrólise desse nucleotídeo nos animais que receberam tratamento crônico com cafeína e agudo com

metilfenidato na dose de 1 mg/kg ($p = 0,040$) em comparação com os animais do grupo controle (Figura 9).

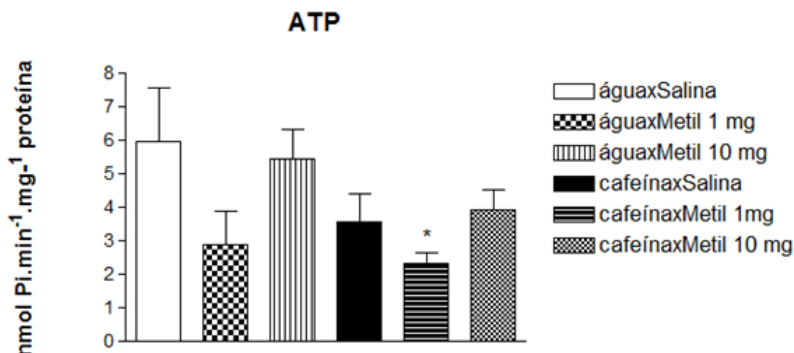


Figura 9. Hidrólise de ATP no hipocampo de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 7-9 animais, para medidas realizadas em triplicata. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. Metil = metilfenidato.

Quando avaliada a hidrólise de ADP no hipocampo não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p = 0,777$) (Figura 10).

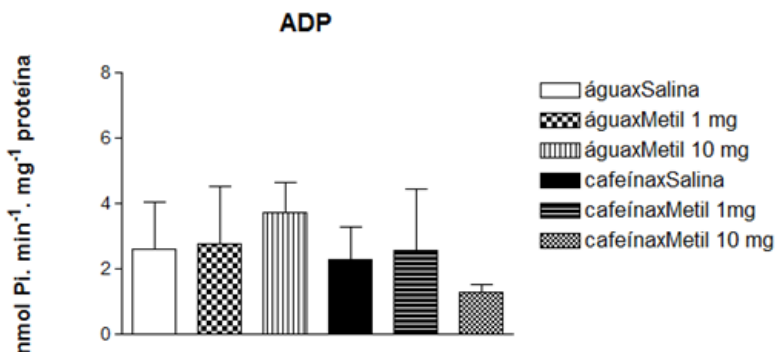


Figura 10. Hidrólise de ADP no hipocampo de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 7-9 animais, para medidas realizadas em triplicata. Metil = metilfenidato.

Na análise da atividade da ecto-5'-nucleotidase, houve também diferença significativa na hidrólise de AMP no hipocampo em animais tratados cronicamente com cafeína e agudamente com metilfenidato 1 mg ou 10 mg, ocorrendo diminuição da hidrólise quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 11). É importante salientar que a enzima ecto-5'-nucleotidase é considerada a enzima marca-passo de formação de adenosina extracelular, já que ela é responsável pela hidrólise de AMP à adenosina.

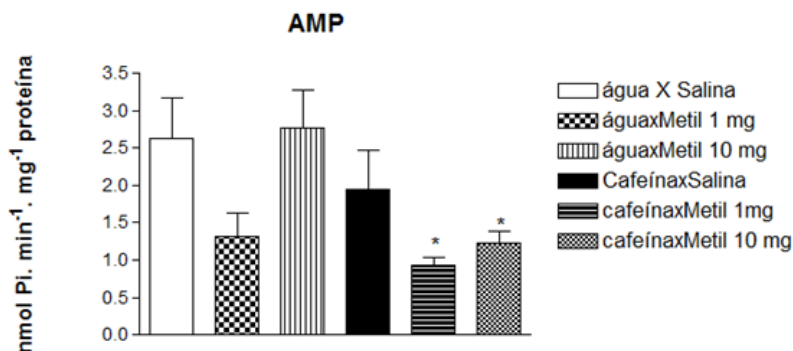


Figura 11. Hidrólise de AMP no hipocampo de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 7-9 animais, para medidas realizadas em triplicata. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; e # $p < 0,05$ comparado ao grupo água + Metil 10. Metil = metilfenidato.

Quando avaliada a hidrólise de ATP no estriado, não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p = 0,801$) (Figura 12).

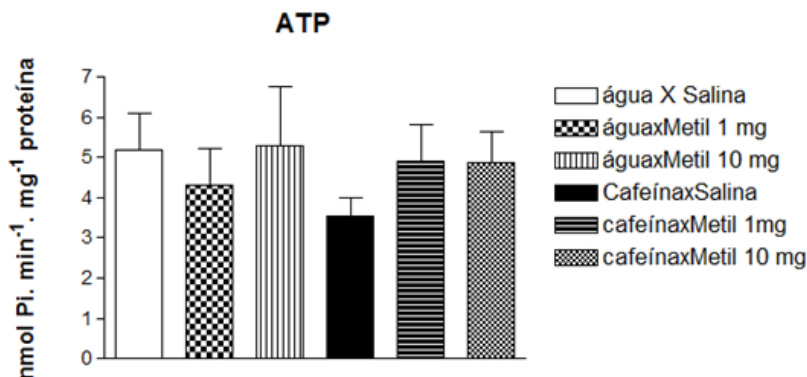


Figura 12. Hidrólise de ATP no estriado de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5-6 animais, para medidas realizadas em triplicata.

Devido a problemas metodológicos no desenvolvimento da técnica enzimática, a medida da hidrólise do ADP não foi realizada no estriado. Quando avaliada a hidrólise de AMP no estriado dos ratos não foi observada diferença significativa entre os grupos de tratamento ($p = 0,715$) (Figura 13).

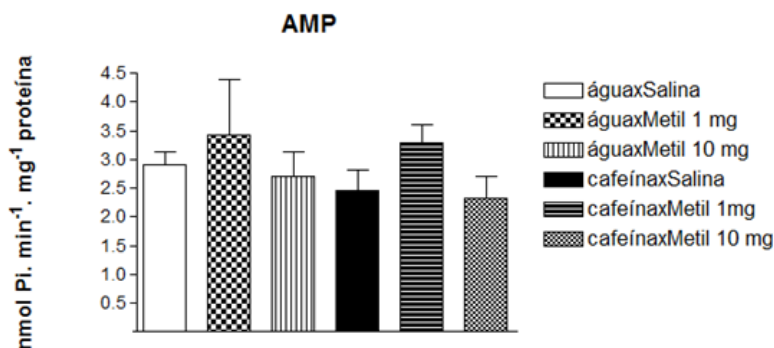


Figura 13. Hidrólise de AMP no estriado de ratos tratados cronicamente com cafeína (0,3 g/L) durante 28 dias e agudamente com metilfenidato. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5-6 animais, para medidas realizadas em triplicata.

10. DISCUSSÃO

A sensibilização cruzada ocorre quando um pré-tratamento com um psicoestimulante leva ao aumento da sensibilização da célula ao efeito de outro psicoestimulante (Antoniou et al., 1998). Há estudos que evidenciam a sensibilização cruzada entre a cafeína e o metilfenidato (Boeck et al., 2009), porém o mecanismo envolvido nesse processo ainda é pouco conhecido, havendo necessidade de mais estudos focando a atuação da cafeína e metilfenidato nas vias celulares pelas quais essas substâncias exercem suas propriedades.

No presente trabalho foi avaliada a atividade locomotora dos ratos tratados cronicamente com cafeína quando adolescentes e de forma aguda com metilfenidato na vida adulta. Observamos que houve sensibilização cruzada de cafeína com metilfenidato na dose de 10 mg/kg. Isso deve ao fato de que, a referida dose não apresentou efeito *per se*, porém, quando administrada em animais tratados com cafeína, induziu a hiperlocomoção. Essa característica comportamental também foi detectada em estudos prévios do grupo onde foi observado que animais tratados com metilfenidato e posteriormente com anfetamina (Valvassori et al., 2007) apresentavam sensibilização, assim como quando tratados com cafeína e depois com metilfenidato (Boeck et al., 2009). Apesar de no presente estudo não ser observada a sensibilização para a dose de 1 mg/kg de metilfenidato como em Boeck e Colls. (2009) e sim para 10 mg/kg, a sensibilização cruzada entre os sistemas adenosinérgico (onde age a cafeína) e dopaminérgico (onde age o metilfenidato) é evidente. A partir desse efeito, investigou-se a participação dos componentes adenosinérgicos celulares, tais como: receptores de membrana plasmática do tipo A_1 e A_{2A} , e cascata enzimática responsável pela produção extracelular do nucleosídeo.

Para avaliar o envolvimento da enzima ecto-5'-nucleotidase na hiperlocomoção induzida pela sensibilização cruzada entre cafeína e metilfenidato, o inibidor desta enzima, o AOPCP, foi administrado por via i.c.v. 5 minutos depois do metilfenidato. Os resultados indicaram nenhuma alteração comportamental induzida por este inibidor, ou seja não reverteu o efeito hiperlocomotor dos ratos tratados com metilfenidato 10 mg/kg que foram tratados cronicamente com cafeína na adolescência. Pode-se especular que a enzima pode ter sido reduzida com o tratamento com cafeína, e portanto, neste caso, não pode-se observar o efeito do AOPCP.

Com o intuito de avaliar a participação dos receptores de adenosina na hiperlocomoção induzida pela sensibilização cruzada entre

caféina e metilfenidato, antagonistas de receptores A_1 e A_{2A} de adenosina (CPT e ZM241385, respectivamente) para ambos os receptores foram administrados por via i.c.v. nos ratos. Não foi observada qualquer alteração na hiperlocomção, o que indica que, no tempo em que os fármacos foram administrados, não há participação da adenosina extracelular. Os resultados comportamentais com os fármacos antagonistas de receptores de adenosina também podem indicar que a caféina pode levar a uma redução (taquifilaxia ou dessensibilização) dos receptores A_1 e A_{2A} de adenosina para favorecer o aumento do receptores de dopamina e, portanto, não se poderia observar o efeito dos antagonistas CPT e ZM241385 em reverter o aumento da locomoção induzido pela sensibilização cruzada entre caféina e metilfenidato.

Outra explicação para os resultados comportamentais encontrados no presente estudo, em que nenhum dos fármacos (AOPCP, CPT e ZM241385) foi capaz de alterar o efeito hiperlocomotor observado nos ratos que apresentam sensibilização cruzada de caféina com metilfenidato 10 mg/kg, pode envolver uma limitação experimental. Os fármacos (AOPCP, CPT e ZM241385), administrados por via i.c.v., utilizados no presente estudo poderiam ter sido administrados com um intervalo de tempo maior antes do metilfenidato e não 5 minutos depois como foi realizado no presente estudo. Estudos posteriores deverão ser realizados para verificar essa possibilidade de ação adenosinérgica.

Outra forma de investigação da participação do sistema adenosinérgico na sensibilização cruzada entre caféina e metilfenidato, é através da medida da atividade das enzimas responsáveis pela sua produção. Assim, foram avaliadas as hidrólises dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, para que fosse verificada a cascata enzimática, a fim de avaliar a relação da sensibilização cruzada entre caféina e metilfenidato com a produção extracelular de adenosina.

Nesse estudo, ocorreu uma diminuição significativa na hidrólise de ATP no hipocampo dos ratos. Sabe-se que a disponibilidade de adenosina extracelular é determinada por um equilíbrio entre a velocidade de decomposição do ATP por ectonucleotidases e a taxa de liberação de ATP e adenosina (Sperlagh e Vizi, 2007) e que a presença de adenosina na fenda sináptica também depende do catabolismo extracelular do ATP promovido pela via das ectonucleotidases (Dunwiddie e Masino, 2001). Sendo assim, a diminuição da hidrólise de ATP encontrada em nosso trabalho indica diminuição na produção de adenosina no hipocampo de animais sob o efeito da sensibilização cruzada dos psicoestimulantes.

Nossos resultados mostram que não houve alteração na hidrólise de ADP. Estudos mostram que nenhuma das NTPDases apresenta maior afinidade por ADP em relação a ATP. A afinidade destas enzimas varia de 1 a 3 vezes mais por ATP que por ADP, dependendo da família de enzimas envolvidas (Kirley et al., 1997; Bigonnesse et al., 2004).

Também foi observado que ocorreu uma alteração significativa na hidrólise de AMP no hipocampo dos ratos, demonstrando que nos animais que receberam o tratamento crônico com cafeína e agudo com metilfenidato em qualquer uma das doses, ocorreu uma diminuição da produção de adenosina extracelular em comparação ao grupo controle. É importante salientar que a enzima ecto-5'-nucleotidase é considerada a enzima marca-passo de formação de adenosina extracelular, já que ela é responsável pela hidrólise de AMP à adenosina (Zimmermann, 2000). O estudo de Zimmermann (1996) mostrou que o ATP e o ADP são potentes inibidores da ecto-5'-nucleotidase.

Sabe-se que a adenosina induz seus efeitos através da ativação de seus receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Burnstock, 1972; Ralevic e Burnstock, 1998; Durwinnie e Masino, 2001; Fredholm et al., 2001), e que os receptores A_1 e A_{2A} apresentam alta afinidade pela adenosina (Ribeiro et al., 2002). No presente estudo foi utilizada a substância cafeína para o tratamento crônico nos ratos, que é um antagonista não seletivo dos receptores A_1 e A_{2A} de adenosina (Hsu et al., 2009).

Evidências sugerem que a maioria dos efeitos psicofarmacológicos da cafeína sejam reproduzidos somente pelos antagonistas dos receptores A_{2A} e não pelos antagonistas do subtipo A_1 , embora a cafeína seja um antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos (Svenningsson et al., 1997; Huang et al., 2005). Acredita-se que o antagonismo adenosinérgico seja responsável pelos efeitos estimulatórios da cafeína (Fredholm, 1980), e que a administração prolongada da cafeína pode causar um pequeno aumento no número de receptores A_1 , em diversas áreas do cérebro (Svenningsson et al., 1999). Após administração crônica, rapidamente é desenvolvida tolerância a esses efeitos estimulantes da cafeína (Finn e Holtzman, 1987; Svenningsson et al., 1999).

Segundo Fredholm (1999) e León et al. (2002), o uso crônico de cafeína pode ou não induzir alterações na funcionalidade dos receptores A_1 e A_{2A} de adenosina. Ferré et al. (2008) presume-se que o tratamento crônico com cafeína leva a modificações na função desses receptores, que podem estar subjacentes a forte tolerância para os efeitos psicomotores da cafeína.

Alguns estudos ainda demonstram que o uso crônico de cafeína promove um aumento na funcionalidade e/ou na expressão dos receptores A_1 de adenosina (Green e Stiles, 1986; Ramkumar et al., 1988; Svennigsson et al., 1999) em diversas regiões do cérebro, podendo inclusive levar a tolerância ao uso dessa substância (Svennigsson et al., 1999). Sabendo que o hipocampo é mais enriquecido com receptores A_1 (Ramkumar et al., 2001), enquanto que o estriado possui mais receptores A_{2A} (Quarta et al., 2004), através do presente estudo demonstra-se que os efeitos da diminuição da hidrólise dos nucleotídeos ocorreram somente no hipocampo, corroborando com os estudos supracitados.

Karcz-Kubicha et al. (2003) demonstrou que os efeitos da ativação motora produzida por doses agudas de cafeína em ratos envolvem bloqueio central tanto de receptores A_1 quanto A_{2A} . Entretanto, durante a exposição crônica a cafeína na água de beber, o aparecimento da tolerância aos efeitos do bloqueio dos receptores A_1 parece ser o principal responsável pela tolerância aos efeitos da hiperativação motora provocada pela cafeína. Já os receptores A_{2A} estariam relacionados aos efeitos residuais dessa ativação motora.

Com isso, concluímos que o uso crônico de cafeína em nosso estudo pode ter gerado a adaptação do sistema adenosinérgico diminuindo a hidrólise de AMP e consequente diminuição de adenosina, quando há desafio estimulador do sistema com metilfenidato. Além de seus efeitos no sistema adenosinérgico, a cafeína ainda possui efeitos de sensibilização cruzada com o metilfenidato. O estudo de Boeck et al. (2009) demonstrou que há importante sensibilização induzida por cafeína no efeito estimulante do metilfenidato com a participação DARPP-32 nas áreas cerebrais dopaminérgicas envolvidas na regulação de comportamentos motores e de ação.

No presente trabalho foi utilizado o metilfenidato no tratamento agudo. É sabido através de estudos que o metilfenidato atua aumentando a concentração extracelular de dopamina na fenda sináptica, que é liberada em resposta a um estímulo (Castellanos et al., 1996; Volkow et al., 1994). A dopamina é um neurotransmissor modulado pela adenosina, sendo que através da ativação dos receptores adenosinérgicos (Durwinnie e Masino, 2001; Fisone et al., 2004) forma-se heterodímeros A_{2A} - D_2 e A_1 - D_1 no cérebro (Ferré et al., 1997; Franco et al., 2007) de interação antagonônica (Ferré et al., 1997; Franco et al., 2007). Sendo assim, o metilfenidato age com menos adenosina no meio. Logo, o efeito da adenosina em bloquear a dopamina está reduzido com o uso do

metilfenidato, facilitando seu efeito via a ação da dopamina em receptores D₁.

Estima-se que os efeitos de antagonistas adenosinérgicos estejam intimamente relacionados com a ativação de receptores dopaminérgicos, sugerindo inclusive que a integridade do sistema dopaminérgico seja imprescindível para que a cafeína exerça seus efeitos estimulatórios (Ferré et al., 1992). Além disso, sabe-se que a sensibilização de receptores da dopamina reforça o efeito da cafeína (Fenu e Morelli, 1998).

Considerando que o uso de metilfenidato atua aumentando os níveis de dopamina e que essa tem efeitos antagônicos aos da adenosina, e sendo a cafeína um antagonista do sistema adenosinérgico, o sistema dopaminérgico poderia estar potencializado após o uso associado de cafeína e metilfenidato, provavelmente devido a baixa ação dos receptores adenosinérgicos devido à menor quantidade de adenosina extracelular disponível.

11. CONCLUSÃO

A cafeína possui efeitos de sensibilização cruzada com o metilfenidato e esta sensibilização pode ter gerado a adaptação do sistema adenosinérgico diminuindo a hidrólise de AMP e induzindo consequentemente a redução da adenosina extracelular. Contudo, adicionais estudos são necessários para avaliar esta interação.

Em uma visão translacional, este estudo visa contribuir para a redução do abuso, mau uso e vício dessas substâncias, visto que ambas possuem propriedades psicoativas e são amplamente usadas pela população.

REFERÊNCIAS

- Adler LA, Spencer T, McGough JJ, Jiang H, Muniz R. Long-term effectiveness and safety of dexamethylphenidate extended release capsules in adult ADHD. *J Atten Disord*. 2009;12(5):449–459.
- Agnati LF, Ferré S, Lluís C, Franco R, Fuxe K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev*. 2003; 55(3):509-50
- Antoniou K, Kafetzopoulos E, Papadopoulou-Daifoti Z, Hyphantis T, Marselos M. D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 1998; 23(2):189-96.
- Arnsten AF. Stimulants: Therapeutic Actions in ADHD. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31(11):2376-83.
- Barone JJ, Roberts HR. Caffeine consumption. *Food Chem. Toxicol*. 1996; 34: 119-129.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*. 2001; 22(6): 724 – 763.
- Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochem J*. 2004; 43(18):5511-9
- Boeck CR, Ganzella M, Lottermann A, Vendite D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia*. 2004; 45(7):745-50.
- Boeck CR, Kroth EH, Bronzatto MJ, Vendite D. Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacology*. 2005; 49(1):17-24.
- Boeck CR, Marques VB, Valvassori SS, Constantino LC, Rosa DV, Lima FF, Romano-Silva MA, Quevedo J. Early long-term exposure with caffeine induces cross-sensitization to methylphenidate with involvement of DARPP-32 in adulthood of rats. *Neurochem Int*. 2009; 55(5):318-22.
- Bonan CD, Schetinger MRC, Battastini AMO, Sarkis JJF. Ectonucleotidases and Synaptic Plasticity: implications in physiological and pathological conditions. *Drug Dev. Res*. 2001; 52:57–65.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- Brundege JM, Dunwiddie TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol.* 1997; 39:353-391.
- Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol.Rev.* 1972; 24(3):509-81.
- Burnstock G. Introduction: P2 Receptors. *Curr Top Med Chem.* 2004; 4(8):793-803.
- Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, Neve K, Fuxe K, Agnati LF, Woods AS, Ferré S, Lluís C, Bouvier M, Franco R. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor–receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem.* 2003; 278(47):46741-9.
- Castellanos FX, Elia J, Kruesi MJ, Gulotta CS, Mefford IN, Potter WZ, Ritchie GF, Rapoport JL. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites in boys with attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res.* 1996; 52:305-316.
- Chan KM, Delfer D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157; 1986:375-380.
- Covington HE, Miczek KA. Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine. Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration “binges”. *Psychopharmacology.* 2001; 158:388-398.
- Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 2001; 38 (2):107-25.
- Daly JW. Caffeine analogs: biomedical impact. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:2153–2169.
- Davis JM, Zhao Z, Stock HS, Mehl KA, Buggy J, Hand GA. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284(2):399-404.
- Del Campo N, Chamberlain SR, Sahakian BJ, Robbins TW. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2011; 69(12):145-57.
- Dews, PB. Caffeine. *Ann. Rev. Nutr.* 1982; 2:323-341.

- Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:31-55.
- Elsworth JD, Roth RH. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors : relevance to gene therapy of parkinson's disease. *Experimental Neurology.* 1997;144:4-9.
- El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois J. SCH 58261 and ZM 241385 differentially prevent the motor effects of CGS 21680 in mice: evidence for a functional 'atypical' adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol.* 2000; 401(1):63-77.
- European Medicines Agency. Meeting highlights from the committee for medicinal products for human use, 16–19 July 2007. London: European Medicines Agency; 2007.
- Fenu S, Morelli, M. Motor stimulant effects of caffeine in 6-hydroxydopamine-lesioned rats are dependent on previous stimulation of dopamine receptors: a different role of D1 and D2 receptors. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10:1878–1884.
- Ferré S, Fuxe K, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience.* 1992; 51(3):501-12.
- Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. Adenosine-dopamine receptor– receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 1997; 20(10):482-7.
- Ferre S, Popoli P, Giménez-Llort L, Rimondini R, Müller CE., Strömberg I, Ogren SO, Fuxe K. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2001; 7:235-241.
- Ferré S, Quiroz C, Woods AS, Cunha R, Popoli P, Ciruela F, Lluís C, Franco R, Azdad K, Schiffmann SN. An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des.* 2008;14(15):1468-74.
- Finn IB, Holtzman SG. Pharmacologic specificity of tolerance to caffeine-induced stimulation of locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl).* 1987; 93(4):428-34.
- Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell.Mol. Life Sci.* 2004; 61(7-8):857-72.
- Franco R, Ferré S, Agnati L, Torvinen M, Ginés S, Hillion J, Casadó V, Lledó P, Zoli M, Lluís C, Fuxe K. Evidence for

- adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 23:50-9.
- Franco R, Casadó V, Cortés A, Ferrada C, Mallol J, Woods A, Lluís C, Canela EI, Ferré S. Basic concepts in G protein-coupled receptor homo- and heteromerization. *ScientificWorldJournal*. 2007; 7:48-57.
- Fredholm BB. Activation of adenylate cyclase from rat striatum and tuberculum olfactorium by adenosine. *Med Biol*. 1977; 55(5):262-7.
- Fredholm BB. Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine. *Trends Pharmacol*. 1980; 1:129-132.
- Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev*. 1999;51(1):83-133.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol.Rev*. 2001; 53(4):527-52.
- Fuxe K, Ungerstedt U. Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. *Med Biol*. 1974; 52(1):48-54.
- Fuxe K, Ferré S, Zoli M, Agnati LF. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998; 26(2-3):258-73.
- Fuxe K, Ferré S, Genedani S, Franco R, Agnati LF. Adenosine receptor–dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav*. 2007; 92(1-2):210-7.
- Gasior M, Jaszyna M, Peters J, Goldberg SR. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 295:1101-11.
- Ginés S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casadó V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(15):8606-11.
- Gerlach M, Grünblatt E, Lange KW. Is the treatment with psychostimulants in children and adolescents with attention deficit

hyperactivity disorder harmful for the dopaminergic system? *Atten Defic Hyperact Disord*. 2013 Jun;5(2):71-81.

Goodman LS, Gilman AG. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 2007; 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, 1821p.

Green RM, Stiles GL. Chronic caffeine ingestion sensitizes the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat cerebral cortex. *J Clin Invest*. 1986; 77(1):222-7.

Greenspan FS, Gardner DG. *Basic and clinical endocrinology*. 7. ed. New York: McGraw-Hill; 2004.

Greenstein B, Greenstein A. *Color Atlas of Neuroscience: Neuroanatomy and Neurophysiology*. New York. 2000;449.

Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci*. 2010; 75(3):77-87.

Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2006; 46(2):101-23.

Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O. Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effects of caffeine. *Nature Neurosci* 2005; (7):858-9.

Kirley TL. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ectoATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J Biol Chem*. 1997; 272(2):1076-81.

Holtzman SG. Discriminative stimulus effects of caffeine: tolerance and cross-tolerance with metilphenidate. *Life Sci*. 1987; 40(4):381-9.

Hsu CW, Chen CY, Wang CS, Chiu TH. Caffeine and a selective adenosine A2A receptor antagonist induce reward and sensitization behavior associated with increased phospho-Thr75-DARPP-32 in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 204(2):313-25.

Hsu CW, Wang CS, Chiu TH. Caffeine and a selective adenosine A2A receptor antagonist induce sensitization and cross-sensitization behavior associated with increased striatal dopamine in mice. *J Biomed Sci*. 2010; 17(1):4.

Hunsucker SA, Mitchell BS, Spychala J. The 5'-nucleotidase as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther*. 2005; 107(1):1-30.

- Jain R, Holtzman SG. Caffeine induces differential cross tolerance to the amphetamine-like discriminative stimulus effects of dopaminergic agonists. *Brain Res Bull.* 2005; 65(5):415-21.
- Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG, Schulenberg JE. Abuse. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services; 2004. Monitoring the future: national survey results on drug use, 1975–2003; pp. 10–12. in NIOB, ed.
- Karcz-Kubicha M1, Antoniou K, Terasmaa A, Quarta D, Solinas M, Justinova Z, Pezzola A, Reggio R, Müller CE, Fuxe K, Goldberg SR, Popoli P, Ferré S. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology.* 2003; 28(7):1281-91.
- Katzung BG. Basic e clinical pharmacology. 8 ed. East Norwalk: Appleton e Lange; 2001.
- Lau CE, Wang J. Aprazolam, caffeine and their interaction; relating DRL performance to pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl).* 1996; 126(2):115-24.
- Lau CE, Wang Y, Falk JL. Differential reinforcement of low rate performance, pharmokinetics, and pharmokinetics-pharmacodynamic modeling: independent interaction of aprazolam and caffeine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 281(3):1013-29.
- León D, Albasanz JL, Ruíz MA, Fernández M, Martín M. Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J Neurochem.* 2002; 82(3):625-34.
- Linssen AM, Vuurman EF, Sambeth A, Riedel WJ. Methylphenidate produces selective enhancement of declarative memory consolidation in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl).* 2012; 221(4):611-9.
- Maggio R, Aloisi G, Silvano E, Rossi M, Millan MJ. Heterodimerization of dopamine receptors: new insights into functional and therapeutic significance. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009; 15(4):2-7.
- Masand P, Pickett P, Murray GB. Psychostimulants for secondary depression in medical illness. *Psychosomatics.* 1991;32:203–208.
- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 2000; 130:1007S-1015S.
- Murray JB. Psychophysiological aspects of amphetamine-methamphetamine abuse. *J. Psychol.* 1998;132:227–237.

- Neary JT, Rathbone MP, Cattabeni F, Abbracchio MP, Burnstock G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* 1996; 19(1):13-8.
- Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, Washington, 1997; 278:58-63.
- Olfson M, Marcus SC, Weissman MM, Jensen PS. National trends in the use of psychotropic medications by children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2002; 41(5):514-21.
- Pacheco R, Pescador BB, Mendonça BP, Ramos SF, Guerrini R, Calo G, Andrade VM, Gavioli EC, Boeck CR. Role of the ecto-nucleotidases in the cooperative effect of adenosine and neuropeptide-S on locomotor activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011; 99(4):726-30.
- Polchert SE, Morse RM. Pemoline abuse. *JAMA.* 1985;254:946-947.
- Post RM, Contel NR. Human and animal studies of cocaine: implications of development of behavioral pathology. In: CREESE, I. (Ed.). *Stimulants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives.* New York: Raven, 1983; p. 169-203.
- Pedrazza EL, Riboldi GP, Pereira GS, Izquierdo I, Bonan CD. Habituation to an open field alters ecto-nucleotidase activities in rat hippocampal synaptosomes. *Neurosci Lett.* 2007; 413(1):21-4.
- Quarta D, Ferré S, Solinas M, You ZB, Hockemeyer J, Popoli P, Goldberg SR. Opposite modulatory roles for adenosine A1 and A2A receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. *J Neurochem.* 2004; 88(5):1151-8.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50 (3):413-492.
- Ramkumar V, Bumgarner JR, Jacobson KA, Stiles GL. Multiple components of the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system are regulated in rat cerebral cortex by chronic caffeine ingestion. *J Clin Invest.* 1988; 82(1):242-7.
- Ramkumar V, Hallam DM, Nie Z. Adenosine, oxidative stress and cytoprotection. *Jpn J Pharmacol.* 2001; 86(3):265-74.
- Reissig CJ, Strain EC, Griffiths RR. Caffeinated energy drinks--a growing problem. *Drug Alcohol Depend.* 2009; 99(1-3):1-10.
- Ribeiro JA, Sebastião AM, de Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 2002; 68(6):377-392.

- Robinson TE, Becker JB. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.* 1986; 396(2):157-98.
- Robinson TE. Persistent sensitizing effects of drugs on brain dopamine systems and behavior implications for addiction and relapse. Em S.G. Korenman e J.D. Barchas (Eds.). *Biological Basis of Substance Abuse*. N.Y: Oxford University Press, 1993.
- Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, Amsterdam, 1993; 18(3):247-291.
- Sarkis JJF, Battastini AMO, Oliveira EM, Frassetto SS, Dias RD. ATP diphosphohydrolases: and overview. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 1995; 47(3):131-6.
- Schenk S, Davidson ES. Stimulant preexposure sensitizes rats and humans to the rewarding effects of cocaine. *NIDA Research monograph*, 1998; 169:56-82.
- Sperlagh B, Vizi E S. Extracellular Interconversion of nucleotides reveals an ecto-adenylate kinase activity in the rat hippocampus. *Neurochem. Res.* 2007; 32:1978–1989.
- Stoof JC, Kebabian JW. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature*. 1981; 294(5839):366-8.
- Svenningsson P, Nomikos GG, Ongini E, Fredholm BB. Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the behavioural activating effects of caffeine and is associated with reduced expression of messenger putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience*. 1997; 79(3):753-64.
- Svenningsson P, Nomikos GG, Fredholm BB. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *J. Neuroscience*. 1999; 19:4011-4022.
- Upadhyaya HP, Rose K, Wang W, O'Rourke K, Sullivan B, Deas D, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder, medication treatment, and substance use patterns among adolescents and young adults. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 2005; 15:799–809.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000; 24:125-132.
- Valvassori SS, Frey BN, Martins MR, Réus GZ, Schimidtz F, Inácio CG, Kapczinski F, Quevedo J. Sensitization and cross-sensitization

- after chronic treatment with methylphenidate in adolescent Wistar rats. *Behav Pharmacol.* 2007; 18(3):205-12.
- Vizi ES, Liang SD, Sperlágh B, Kittel A, Jurányi Z. Studies on the release and extracellular metabolism of endogenous ATP in rat superior cervical ganglion: support for neurotransmitter role or ATP. *Neuroscience.* 1997; 79(3):893-903.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler M, Logan J, Schlyer D, Hitzemann R et al. Imaging endogenous dopamine competition with (11C)raclopride in the human brain. *Synapse.* 1994; 16(4):255-262.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang G, Ding Y, Gatley SJ. Mechanism of action of methylphenidate: Insights from PET imaging studies. *J Atten Disord.* 2002; 6(1):31-43.
- Wang Y, Lau CE. Caffeine has similar pharmacokinetics and behavioral effects via the IP and PO routes of administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998; 60(1):271-8.
- Weyandt LL, DuPaul GJ. ADHD in college students: a review of the literature. *J Atten Disord.* 2006;10(1):9-19.
- Weyandt LL, Marraccini ME, Gudmundsdottir BG, et al. Misuse of prescription stimulants among college students: a review of the literature and implications for morphological and cognitive effects on brain functioning. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2013;21(5):385-407.
- Wong CG, Stevens MC. The Effects of Stimulant Medication on Working Memory Functional Connectivity in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry.* 2012; 71(5):458-66
- Zhu J, Spencer TJ, Liu-Chen LY, Biederman J, Bhide PG. Methylphenidate and μ -opioid receptor interactions: A pharmacological target for prevention of stimulant abuse. *Neuropharmacology.* 2011; 61(1-2):283-92.
- Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 1996; 49(6):589-618.
- Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int.* 1998; 32(5-6):421-5.
- Zimmermann H. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20(6):231-6.
- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000; 362(4-5):299-309.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 2001; 52:44-56.

Zuvekas SH, Vitiello B, Norquist GS. Recent trends in stimulant medication use among U.S. children. *Am J Psychiatry.* 2006;163(4):579-85.

ANEXO(S)

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



Resolução



A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 110/2013-2

Professor Responsável: Carina Rodrigues Boeck.

Equipe: João Luciano de Quevedo, Lia Beatriz Bortolotto Spillere, Michelle Lima Garcez, Robson Pacheco, Lucas Rodrigues e Neidiana dos Santos Francisco.

Título: “Avaliação da memória e a atividade de ecto-nucleotidases no cérebro de ratos Wistar adultos tratados agudamente com metilfenidato após tratamento crônico com cafeína durante o período de adolescência”.

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 192 Ratos heterogêneo Wistar de 25 dias de 75-85 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesp.net.*

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 110/2013-2

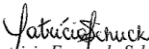
Principal Investigator: Carina Rodrigues Boeck.

Researchers: João Luciano de Quevedo, Lia Beatriz Bortolotto Spillere, Michelle Lima Garcez, Robson Pacheco, Lucas Rodrigues, Neidiana dos Santos Francisco.

Project title: “Evaluation of memory and ecto-nucleotidase activities in the brain of adult Wistar rats acutely treated with methylphenidate following chronic treatment with caffeine during its adolescence”.

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesp.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesp.net.*

Criciúma, 10 de dezembro de 2013.


 Patricia Fernanda Schuck
 Coordenadora da CEUA